

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2003. 09. 19

申 请 号: 03150997. 5

REC'D 01 DEC 2004

WIPO

PCT

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 广防风昔A 及其制备和应用

申 请 人: 上海药港生物技术有限公司

发明人或设计人: 黄寰

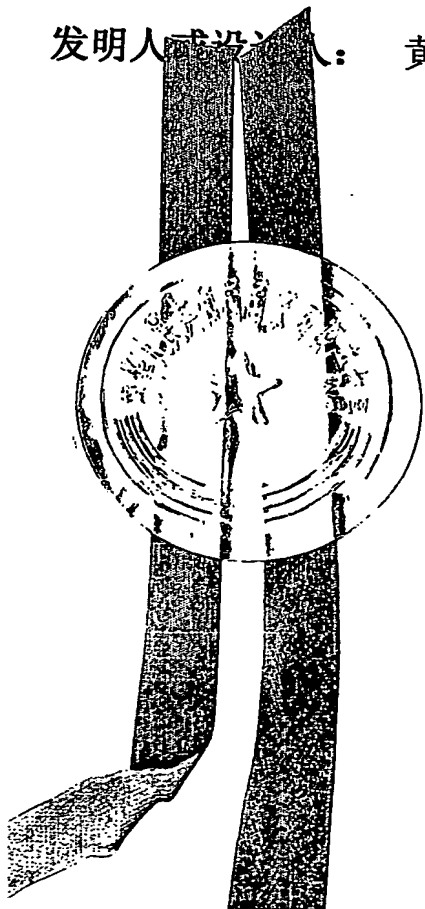
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

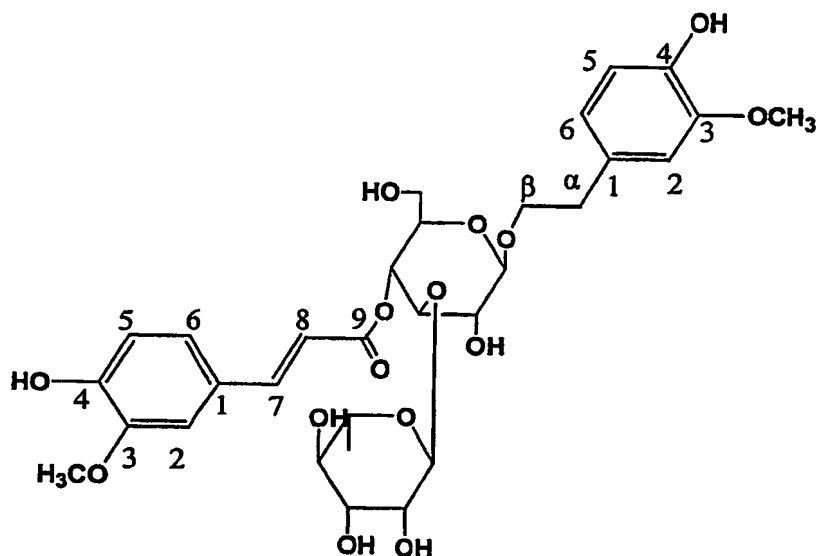
王 景 川

2004 年 10 月 22 日



权利要求书

1、一种广防风苷 A，具有式 I 结构：



I

2、根据权利要求 1 所述的广防风苷 A 的制备方法，其特征在于该化合物通过下述方法获得：

取广防风根粗粉 6Kg，加 10 倍量的水加热提取 3 次，回收水至 600ml，加水饱和的正丁醇萃取 3 次，回收正丁醇至干，加蒸馏水 500ml 溶解后上 AB-8 大孔树脂，依次用 20%，50%，95%的乙醇洗脱，回收 50%的乙醇洗脱液至干，加适量 50%的甲醇-水 (v/v) 溶解，上 C-18 硅胶柱，用 50%的甲醇-水 (v/v) 洗脱，分部收集，薄层检查，合并，回收，即得。

3、根据权利要求 1 所述广防风苷 A 在制备治疗预防与雌激素、孕激素平衡失调有关疾病的药物和作为含量标示物在广防风根提取物及其制剂用 HPLC 法测定含量方法中的应用。

4、根据权利要求 3 所述应用，其特征在于其中所述的广防风苷 A 作

为含量标示物在广防风根提取物及其制剂用 HPLC 法测定含量方法包括下述步骤:

a、仪器与材料:

仪器: Aglient1100 高效液相色谱仪

对照品: 广防风苷 A

试剂: 甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品: 广防风根提取物

b、色谱条件:

色谱柱: Discovery C18, 250*4.6mm, 5um

流动相: 乙腈: 水=27: 73

流速: 1.0ml/min 柱温: 室温

检测波长: 320nm 进样量: 20ul

c、标准曲线

①标准储备液的制备: 精密称取对照品 4.95mg, 加甲醇超声溶解, 定量到 25ml;

②标准曲线的绘制: 精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别得浓度为 39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml 的 Y1 标准液, 采用以上色谱条件, 进样 20ul, 以峰面积 Y 为纵坐标, Y1 浓度 X 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$, 线性范围: 0.792~3.96ug, Y1 出峰时间为 9.55min

d、样品测定:

对照品溶液配制: 精密称取对照品一定量, 加甲醇超声溶解, 定容, 分别吸取供试品溶液 20ul, 按上述液相条件测定, 记录峰面积, 并用标准曲线计算 Y1 的含量;

供试液的制备: 取广防风根提取物粉末, 精密称取, 置于离心管中, 加水超声提取两次, 离心, 取上清液, 残渣再用水洗, 合并上清液和洗液, 定容至 10ml 容量瓶中, 进样前用 0.45μm 滤膜过滤;

取以上供试液在色谱条件下进样, 按双点校正法计算样品中所含组分的含量, 计算公式如下:

03-10-08

$$Y=20.139X-154.35$$

Y 为峰面积值;

X 为样品的浓度 ug/ml;

则样品中广防风的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\%$ 。

说明书

广防风苷 A 及其制备和应用

技术领域：

本发明涉及制药领域，具体涉及一种从广防风根中提取分离获得的新化合物—广防风苷 A 及其制备和应用。

背景技术：

对更年期综合征的治疗，长期以来都是使用雌激素类制剂，但由于激素有诸多的副作用及不良反应，甚至可能导致癌症，不易被广大妇女所接受。因此，就目前来说，在临床上尚无较为理想的药物。

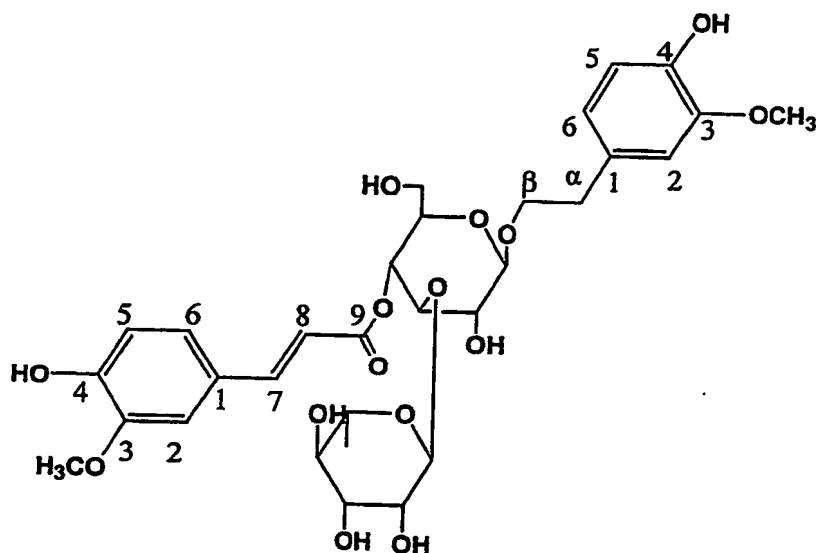
广防风，又名防风草，拉丁名 *Epimeredi indica*(L.) Rothmalex，在《中药大辞典》中有记载，为唇形科植物防风草的全草，主要用于治疗感冒身热，呕吐，腹痛，筋骨疼痛，疮疡，湿疹，痔疾等；在中华人民共和国卫生部颁标准《中药成方制剂》第二十册的贯防感冒片，是组方中的一味药。

本发明申请人已在中国专利申请 02110522.7 中公开了广防风根的新用途。广防风根具有改善卵巢功能和调节雌激素和孕激素的作用，可用于制备治疗预防与雌激素、孕激素平衡失调有关的疾病的药物或保健品。

发明内容：

本发明所要解决的技术问题是对广防风根进行进一步研究，分离纯化其有效部位，提供一种广防风根主要活性成份单体广防风苷 A。

本发明公开的广防风苷 A 具有下述式 I 结构：



I

化学名：3-（4-羟基-3-甲氧基-苯基）-丙烯酸 5-羟基-6-[2-（4-羟基-3-甲氧基-苯基）-乙氧基]-2-羟甲基-4-鼠李糖-四氢吡喃-3-酯

根据化合物的 UV、IR、ESI、HRESI、NMR、2D-NMR(COSY、HMQC、HMBC、NOESY)鉴定化合物广防风苷 A, 分子式为 $C_{13}H_{40}O_{15}$, 分子量为 652, 熔点 $139\sim 142^{\circ}\text{C}$, 其结构式如式 1; 信号归属如表 1。广防风苷 A 核磁共振 ^{13}C 谱见图 1, 广防风苷 A 核磁共振 ^1H 谱见图 2, 广防风苷 A 红外图谱见图 3, 广防风苷 A 紫外图谱见图 4, 广防风苷 A 质谱见图 5。

表 1 化合物广防风苷 A 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据(CD_3OD , 500MHz)

| Ferulic acid | $\delta \text{ C}$ | $\Delta \text{ H}$ | Aglycone | $\Delta \text{ C}$ | $\delta \text{ H}$ |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 127.68 | | 1 | 132.69 | |
| 2 | 111.66 | 7.15(d, 2) | 2 | 117.00 | 6.69(d, 2) |
| 3 | 150.64 | | 3 | 147.47 | |
| 4 | 149.36 | | 4 | 147.33 | |
| 5 | 116.47 | 6.80(d, 8) | 5 | 112.81 | 6.65(d, 8) |
| 6 | 124.27 | 7.02(dd, 8, 2) | 6 | 121.11 | 6.61(dd, 8, 2) |
| 7 | 147.10 | 7.62(d, 16) | α | 36.71 | 2.80(t, 7) |
| 8 | 115.28 | 6.39(d, 16) | β | 72.31 | 3.5—4.2 |
| 9 | 169.07 | | OCH_3 | 55.40 | 3.76(s) |
| OCH_3 | 55.44 | 3.86(s) | | | |

| Glucose | δC | ΔH | Rhamnose | ΔC | δH |
|---------|------------|------------|----------|------------|------------|
| 1 | 104.39 | 4.33(d, 8) | 1 | 102.73 | 5.18(d, 1) |
| 2 | 75.66 | 3.5—4.2 | 2 | 72.34 | 3.5—4.2 |
| 3 | 84.08 | 3.53(m) | 3 | 72.25 | 3.5—4.2 |
| 4 | 70.54 | 3.5—4.2 | 4 | 73.99 | 3.5—4.2 |
| 5 | 75.37 | 3.5—4.2 | 5 | 70.05 | 3.5—4.2 |
| 6 | 64.68 | 4.41(m) | 6 | 17.88 | 1.25(d, 6) |

本发明广防风苷 A 是通过下述技术方案获得的：

取广防风根粗粉 6Kg，加 10 倍量的水加热提取 3 次，回收水至 600ml，加水饱和的正丁醇萃取 3 次（400ml/次），回收正丁醇至干，加蒸馏水 500ml 溶解后上大孔树脂（AB-8），依次用 20%，50%，95% 的乙醇洗脱，回收 50% 的乙醇洗脱液至干，加适量 50% 的甲醇-水（v/v）溶解，上 C-18 硅胶柱，用 50% 的甲醇-水（v/v）洗脱，分部收集，薄层检查，合并，回收，得广防风苷 A。

本发明所要解决的另一技术问题在于公开上述广防风苷 A 在制备治疗预防与雌激素、孕激素平衡失调有关疾病药物中的应用，以及作为广防风根活性成份提取物含量检测标示物的应用。

广防风根提取物是由广防风根部经水提、浓缩后获得的浸膏，广防风根苷 A 是广防风根提取物中的主要活性成份，同样具有改善卵巢功能和调节雌激素和孕激素的作用，可用于制备治疗预防与雌激素、孕激素平衡失调有关疾病的药物。

同时广防风根提取物及其制剂在采用 HPLC 法测定含量方法中，采用广防风苷 A 作为含量的标示物，可准确、灵敏地确定提取物的活性成份含量，以方便地控制所述药物的使用剂量。

以广防风苷 A 作为含量的标示物测定广防风根提取物含量的方法包括：

a、仪器与材料：

仪器：Aglient1100 高效液相色谱仪

对照品：广防风苷 A

试剂：甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品：广防风根提取物

b、色谱条件：

色谱柱: Discovery C18 (250*4.6mm, 5um)

流动相: 乙腈: 水=27: 73

流速: 1.0ml/min 柱温: 室温

检测波长: 320nm 进样量: 20ul

c、标准曲线

①标准储备液的制备: 精密称取对照品 4.95mg, 加甲醇超声溶解, 定量到 25ml;

②标准曲线的绘制: 精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别得浓度为 39.6ug/ml, 79.2 ug/ml, 118.8 ug/ml, 158.4 ug/ml, 198 ug/ml 的 Y1 标准液, 采用以上色谱条件, 进样 20ul。以峰面积 (Y) 为纵坐标, Y1 浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=20.139X-154.35$; $R^2=0.9994$, 线性范围: 0.792~3.96ug, Y1 出峰时间为 9.55min

d、样品测定:

对照品溶液配制: 精密称取对照品一定量, 加甲醇超声溶解, 定容, 分别吸取供试品溶液 20ul, 按上述液相条件测定, 记录峰面积, 并用标准曲线计算 Y1 的含量;

供试液的制备: 取广防风根提取物粉末, 精密称取 170.5mg, 置于离心管中, 加水超声提取两次, 离心, 取上清液, 残渣再用水洗, 合并上清液和洗液, 定容至 10ml 容量瓶中, 进样前用 0.45 μ m 滤膜过滤;

取以上供试液在色谱条件下进样, 按双点校正法计算样品中所含组分的含量, 计算公式如下:

$$Y=20.139X-154.35$$

Y 为峰面积值;

X 为样品的浓度 μ g/ml;

则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\%$ 。

下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

附图说明:

- 图 1 广防风苷 A 核磁共振 ^{13}C 谱
图 2 广防风苷 A 核磁共振 ^1H 谱
图 3 广防风苷 A 红外图谱
图 4 广防风苷 A 紫外图谱
图 5 广防风苷 A 质谱
图 6 广防风苷 A HPLC 图
图 7 广防风根提取物 HPLC 图

具体实施方式:

实施例 1、广防风苷 A 制备

(1) 取广防风根，粉碎，加 10 倍量的水，煎煮 2 小时，滤液待用，残渣加 8 倍量水，煎煮 2 小时，滤过，合并滤液，滤液浓缩，喷雾干燥或真空干燥，得广防风根提取物。

(2) 取广防风根提取物 6Kg，加 10 倍量的水加热提取 3 次，回收水至 600ml，加水饱和的正丁醇萃取 3 次 (400ml/次)，回收正丁醇至干，加蒸馏水 500ml 溶解后上大孔树脂 (AB-8，天津南开大学化工厂)，依次用 20%，50%，95% 的乙醇洗脱，回收 50% 的乙醇洗脱液至干，加适量 50% 的甲醇-水 (v/v) 溶解，上 C-18 硅胶柱，用 50% 的甲醇-水 (v/v) 洗脱，分部收集，薄层检查，合并，回收，得广防风苷 A。

根据化合物的 UV、IR、ESI、HRESI、NMR、2D-NMR(COSY、HMQC、HMBC、NOESY) 鉴定化合物广防风苷 A，分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$ ，分子量为 652，熔点 $139\sim 142^\circ\text{C}$ ，其结构式如式 1；信号归属如表 1，广防风苷 A 核磁共振 ^{13}C 谱见图 1，广防风苷 A 核磁共振 ^1H 谱见图 2，广防风苷 A 红外图谱见图 3，广防风苷 A 紫外图谱见图 4，广防风苷 A 质谱见图 5。。

表 1 化合物广防风苷 A 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据(CD_3OD , 500MHz)

| Carbolic acid | δC | ΔH | Aglycone | ΔC | δH |
|------------------|------------|----------------|------------------|------------|----------------|
| 1 | 127.68 | | 1 | 132.69 | |
| 2 | 111.66 | 7.15(d, 2) | 2 | 117.00 | 6.69(d, 2) |
| 3 | 150.64 | | 3 | 147.47 | |
| 4 | 149.36 | | 4 | 147.33 | |
| 5 | 116.47 | 6.80(d, 8) | 5 | 112.81 | 6.65(d, 8) |
| 6 | 124.27 | 7.02(dd, 8, 2) | 6 | 121.11 | 6.61(dd, 8, 2) |
| 7 | 147.10 | 7.62(d, 16) | α | 36.71 | 2.80(t, 7) |
| 8 | 115.28 | 6.39(d, 16) | β | 72.31 | 3.5—4.2 |
| 9 | 169.07 | | OCH ₃ | 55.40 | 3.76(s) |
| OCH ₃ | 55.44 | 3.86(s) | | | |
| Glucose | δC | ΔH | Rhamnose | ΔC | δH |
| 1 | 104.39 | 4.33(d, 8) | 1 | 102.73 | 5.18(d, 1) |
| 2 | 75.66 | 3.5—4.2 | 2 | 72.34 | 3.5—4.2 |
| 3 | 84.08 | 3.53(m) | 3 | 72.25 | 3.5—4.2 |
| 4 | 70.54 | 3.5—4.2 | 4 | 73.99 | 3.5—4.2 |
| 5 | 75.37 | 3.5—4.2 | 5 | 70.05 | 3.5—4.2 |
| 6 | 64.68 | 4.41(m) | 6 | 17.88 | 1.25(d, 6) |

实施例 2、广防风根提取物含量测定

a、仪器与材料:

仪器: Aglient1100 高效液相色谱仪

对照品: 广防风苷 A (实施例 1 方法获得)

试剂: 甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

样品: 广防风根提取物 (实施例 1 步骤 (1) 获得)

b、色谱条件:

色谱柱: Discovery C18 (250*4.6mm, 5 μ m)

流动相: 乙腈: 水=27: 73

流速: 1.0ml/min 柱温: 室温

检测波长: 320nm 进样量: 20 μ l

c、标准曲线

①标准储备液的制备: 精密称取对照品 4.95mg, 加甲醇超声溶解, 定量到 25ml

②标准曲线的绘制: 精密吸取对照品储备液各 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 于 2ml 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别得浓度为 39.6 μ g/ml, 79.2 μ g/ml, 118.8 μ g/ml, 158.4 μ g/ml, 198 μ g/ml 的 Y1 标准液, 采用

以上色谱条件，进样 20ul。以峰面积（Y）为纵坐标，Y1 浓度（X）为横坐标，进行线性回归，得回归方程 $Y=20.139X-154.35$ ； $R^2=0.9994$ ，线性范围：0.792~3.96ug，Y1 出峰时间为 9.55min

峰面积

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------|---------|---------|----------|----------|----------|
| 进样浓度 (ug/ml) | 39.6 | 79.2 | 118.8 | 154.4 | 198 |
| 峰面积 (mAU) | 612.811 | 1472.17 | 2234.391 | 3036.277 | 3802.776 |

d、样品测定：

对照品溶液配制：精密称取对照品一定量，加甲醇超声溶解，定容，分别吸取供试品溶液 20ul，按上诉液相条件测定，记录峰面积，并用标准曲线计算 Y1 的含量；见图 6

供试液的制备：取广防风根提取物粉末，精密称取 176.35mg，置于离心管中，加水超声提取两次，离心，取上清液，残渣再用水洗，合并上清液和洗液，定容至 10ml 容量瓶中，进样前用 0.45 μ m 滤膜过滤；

取以上供试液在色谱条件下进样，见图 7，按双点校正法计算样品中所含组分的含量， $Y=452.136$ ，

根据 $Y=20.139X-154.35$ ，计算得 $X=30.115\text{ug/ml}$ ，则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\%=0.17\%$ 。

实施例 3、广防风根胶囊含量测定

a、仪器与材料：

仪器：Aglient1100 高效液相色谱仪

样品：广防风根胶囊（含广防风根提取物，0.39g/粒，由上海药港生物技术有限公司生产）

对照品：广防风苷 A(实施例 1 方法获得)

试剂：甲醇、乙腈、蒸馏水等所有试剂为分析纯

b、色谱条件：

色谱柱：Dsiccovery C18 (250*4.6mm, 5um)

流动相：乙腈：水=27：73

流速：1.0ml/min 柱温：室温

检测波长：320nm 进样量：20ul

c、标准曲线的建立（同实施例 2）

d、样品测定

对照品溶液配制：精密称取对照品一定量，加甲醇超声溶解，定容，分别吸取供试品溶液 20ul，按上述液相条件测定，记录峰面积，并用标准曲线计算 Y1 的含量；

供试液的制备：取广防风根胶囊内容物，研磨成粉末，过 40 目筛，精密称取 0.5g，置于离心管中，加甲醇超声提取两次，离心，取上清液，残渣再用水洗，合并上清液和洗液，定容至 10ml 容量瓶中。进样前用 0.45μm 滤膜过滤。

取以上供试液在色谱条件下进样，按双点校正法计算样品中所含组分的含量， $Y=221.61$ ，

根据 $Y=20.139X-154.35$ ，计算得 $X=18.67\mu\text{g/ml}$ ，则样品中广防风苷 A 的含量为 $X*10/\text{取样量}*100\%=1.06\%$ 。

03-10-03

说明书附图

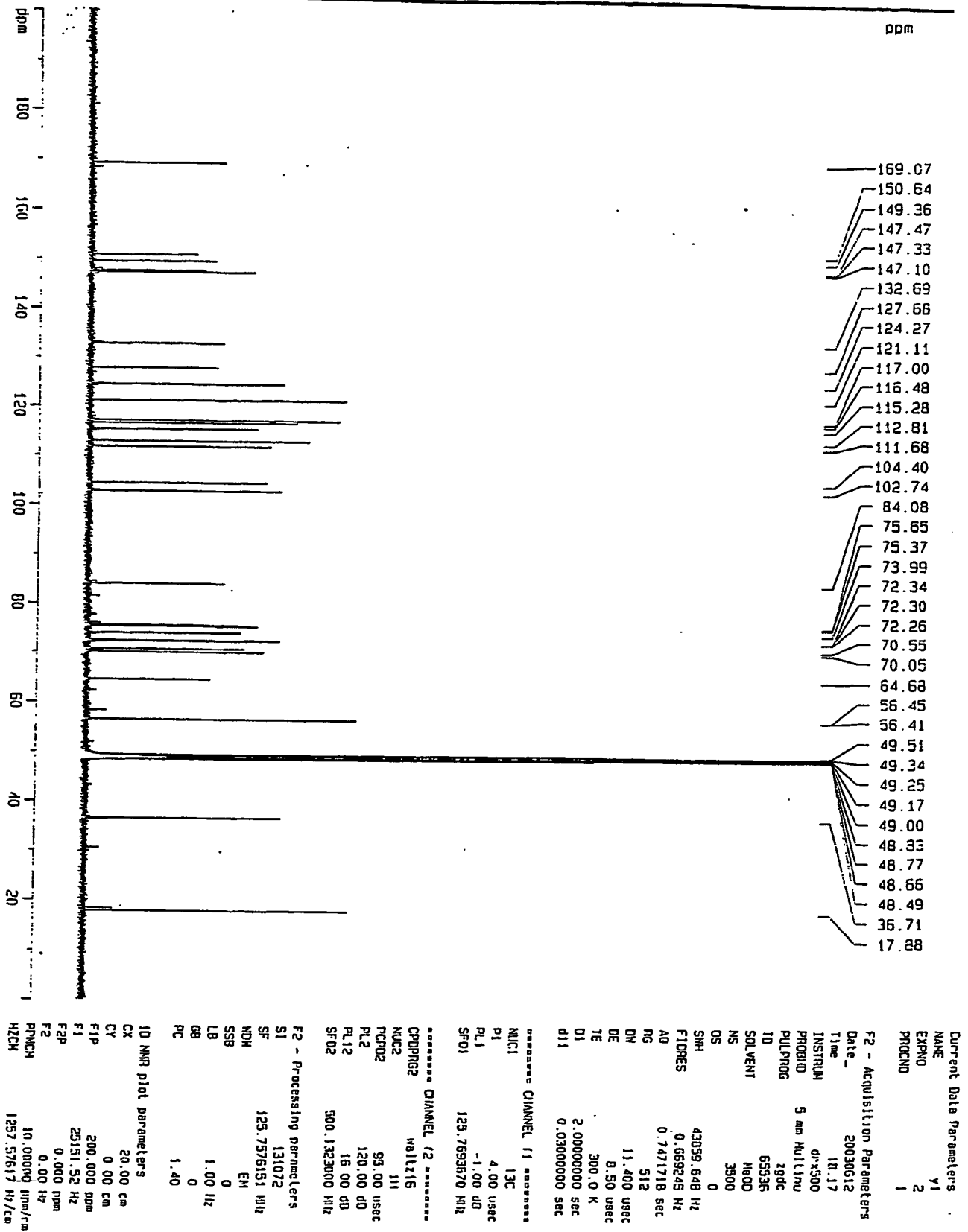
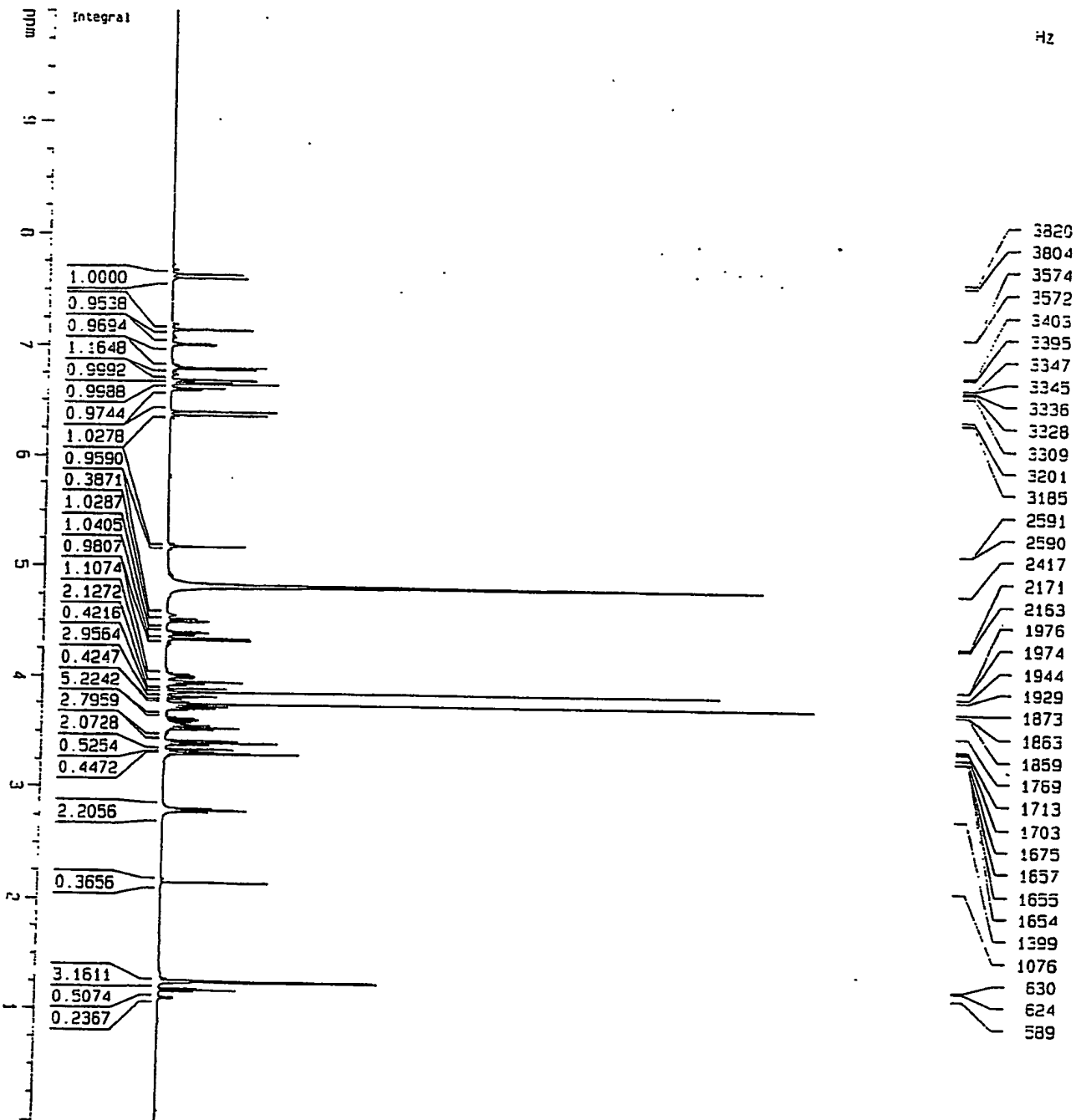


图 1

03.10.03



Current Data Parameters
NAME V1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20030613
Time 0.34

INSTRUM drx300
PROBHD 5 mm Nujol
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOH
NS 16
DS 0

SMH 15015.015 Hz
FIDRES 0.229111 Hz
AQ 2.1024322 sec
RG 32
DN 33.300 usec
DE 9.50 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
PI 5.00 usec
PL1 -5.00 dB
SFO1 500.1362158 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300109 MHz
KOH no
SSN 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
CY 0.00 cm
FLP 10.000 ppm
F1 5001.30 Hz
F2 0.000 ppm
PCPCH 0.50000 ppm/cm
HZCH 250.06500 Hz/cm

05-10-09

17

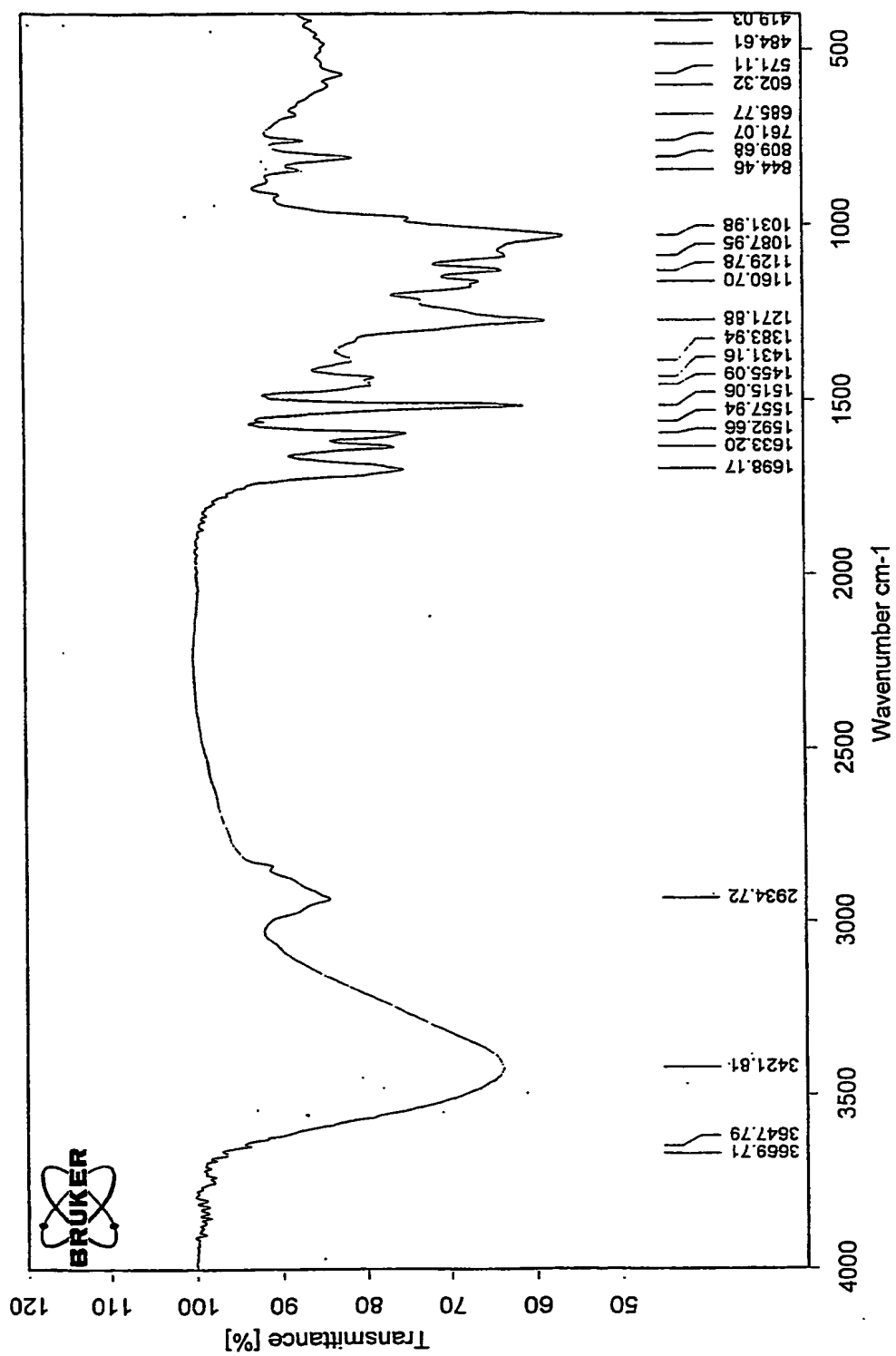


图 3

03-10-09

11

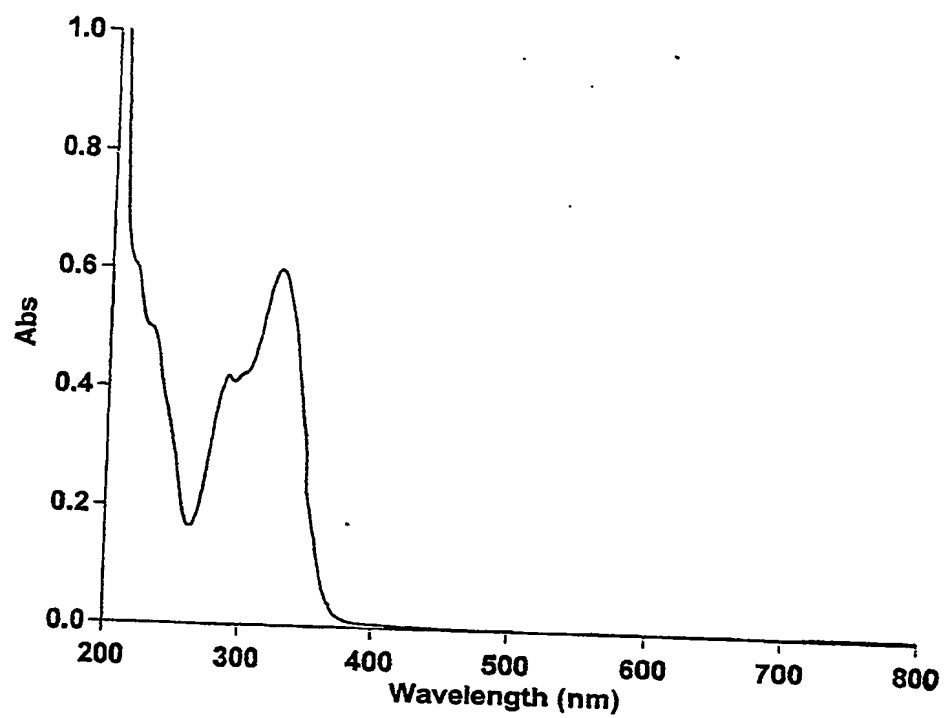


图 4

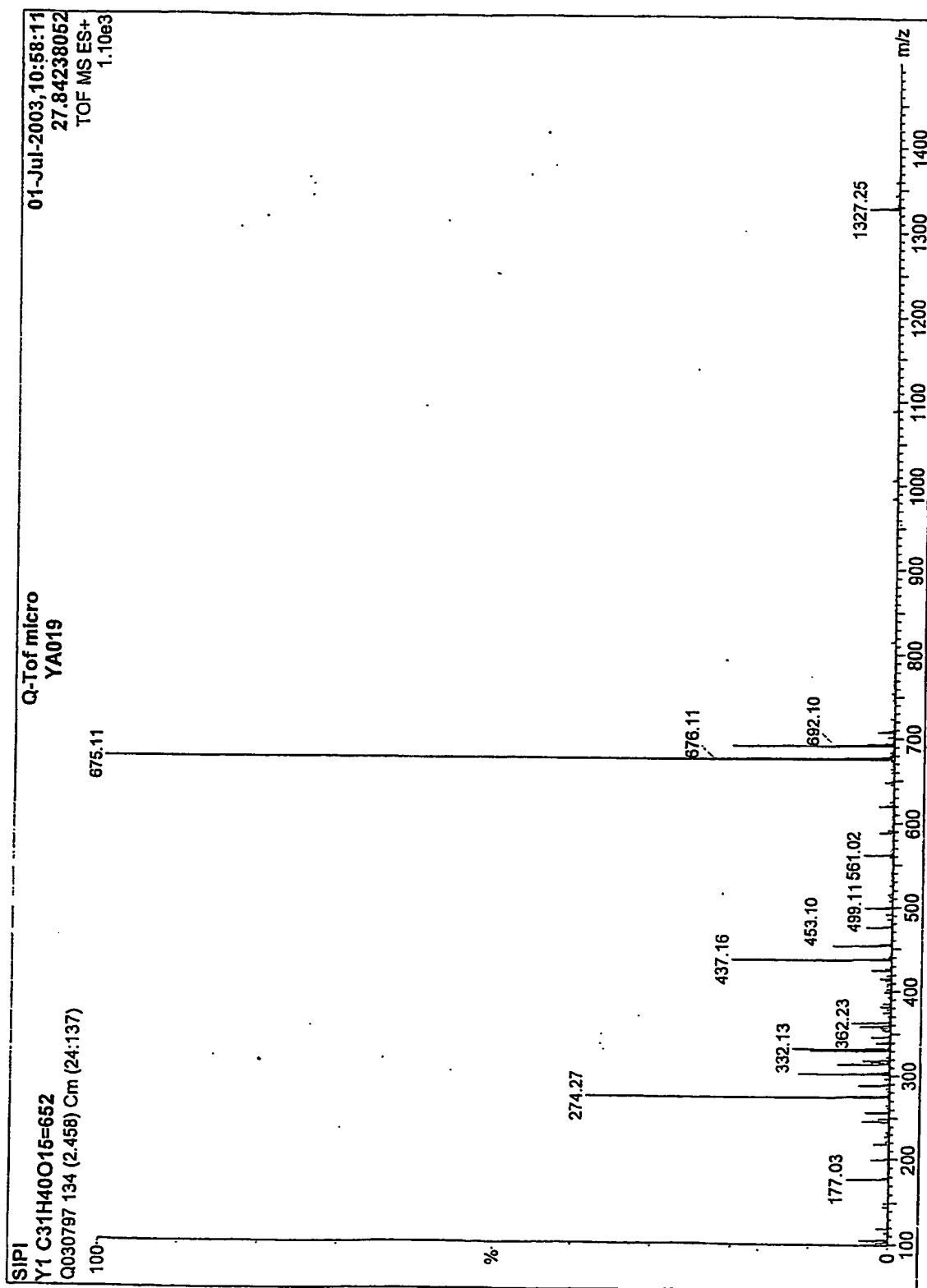
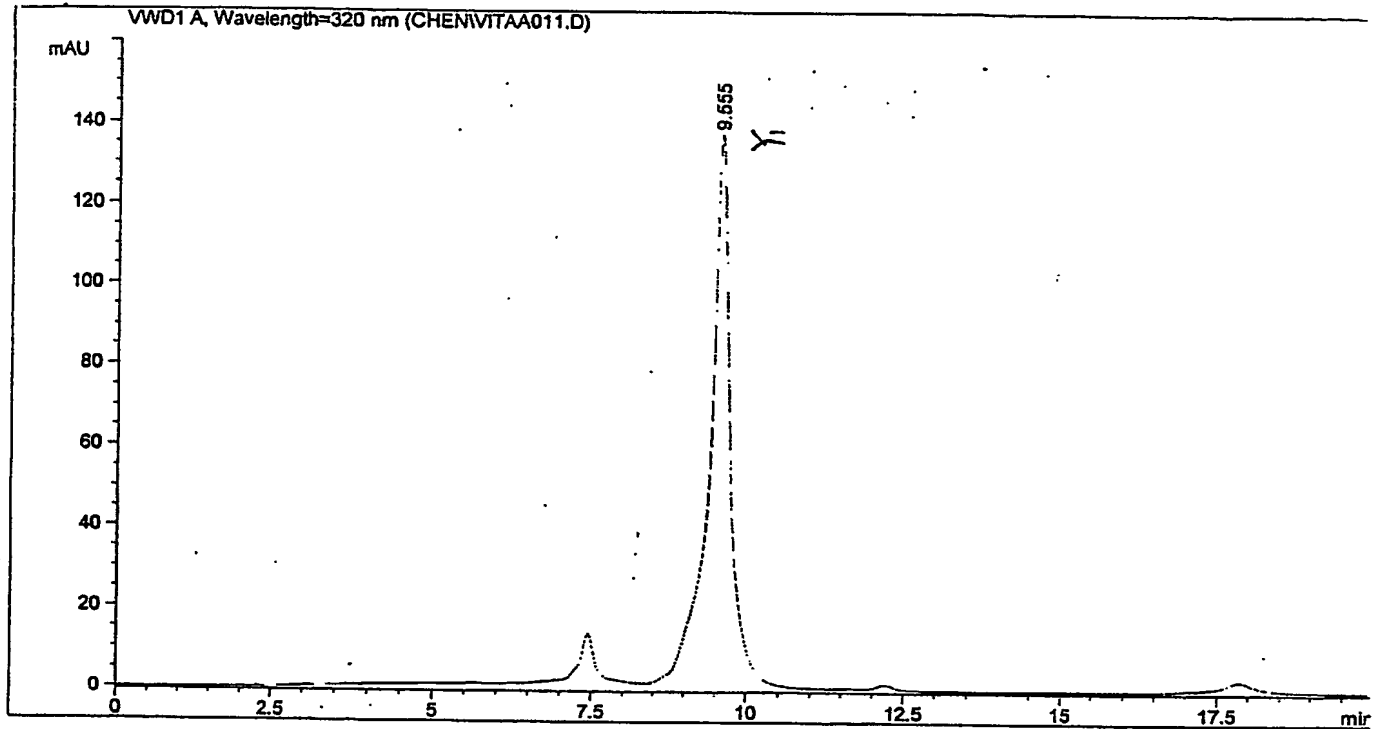


图 5

03-10-03

2



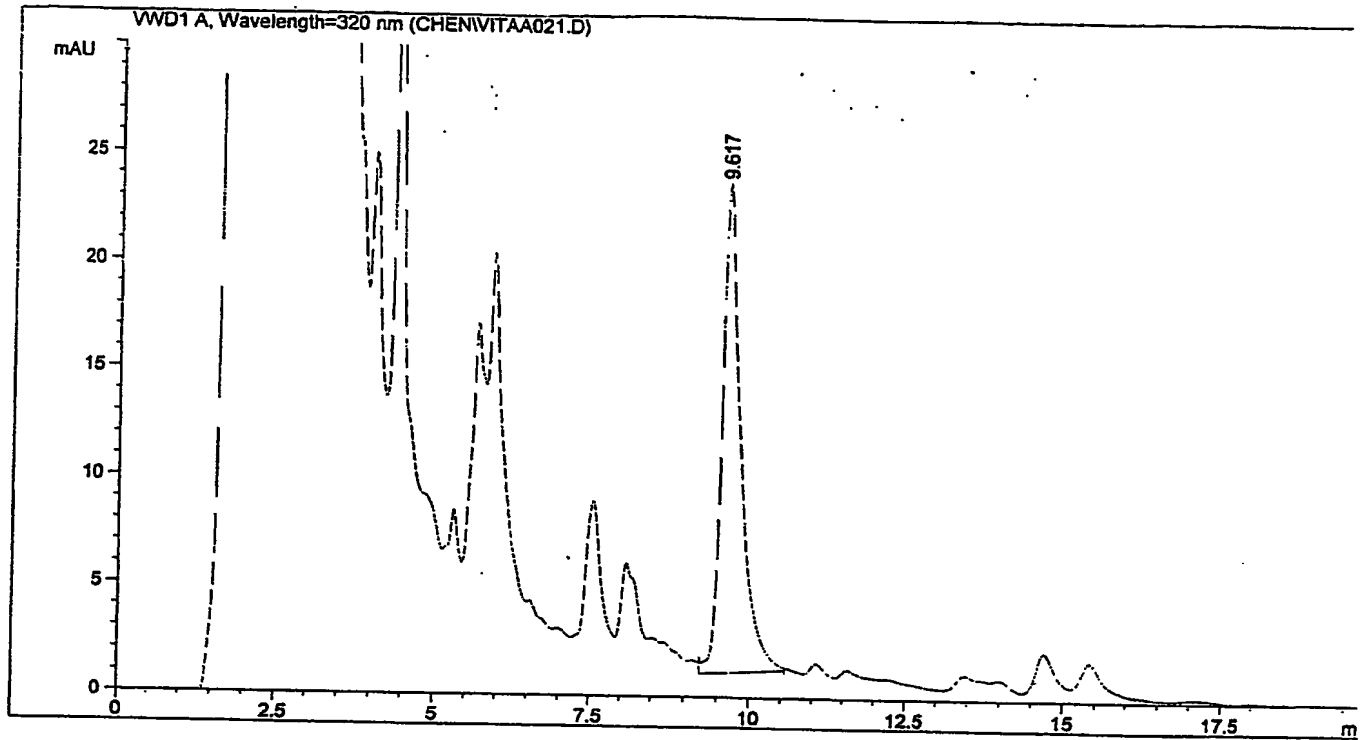
Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm
Results obtained with enhanced integrator!

| RetTime [min] | k' | Area mAU *s | Height [mAU] | Symm. | Width [min] | Plates | Resol | Select ution | ivity |
|------------------|----|----------------|-----------------|-------|----------------|--------|-------|-----------------|-------|
| 9.555 | - | 3789.69067 | 137.40930 | 1.57 | 0.2572 | 7644 | - | - | - |

图 6



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|----------|
| 1 | 9.617 | VB | 0.2769 | 452.13614 | 22.61640 | 100.0000 |

Totals : 452.13614 22.61640

图 7